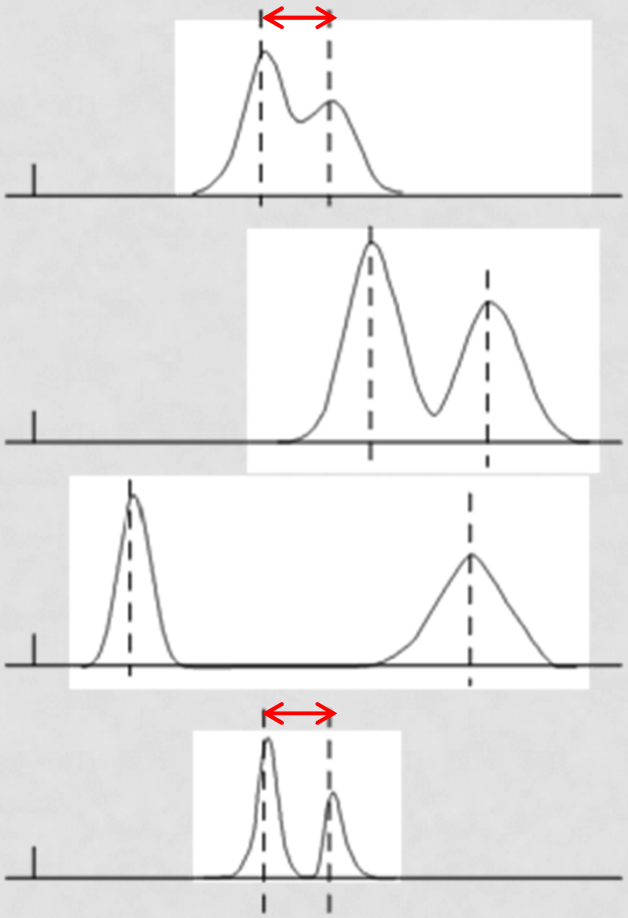
LA PURIFICATION DANS LE LABORATOIRE DE SYNTHÈSE

CHANTAL ZEDDE
SERVICE HPLC SPCMIB/ICT/PICT TOULOUSE III

QUEL MOYEN D'ÉVALUATION ?

- Chromatographie sur couche mince
  - Rapide à mettre en œuvre
  - Faible coût
  - Insuffisant pour la phase inverse
- HPLC
  - Plus de précision si la colonne analytique et la colonne « prep » contiennent la même phase stationnaire
  - Très reproductible en phase inverse

GRANULOMÉTRIE DE LA PHASE STATIONNAIRE ET RÉSOLUTION



Granulométrie élevée
Résolution faible, améliorée en :

- augmentant les facteurs de rétention en diminuant le pouvoir éluant,
- augmentant la quantité de phase stationnaire,
- changeant de phase stationnaire,

- augmentant la sélectivité par modification des solvants

- augmentant le nombre de plateau théorique en diminuant la granulométrie de la phase stationnaire

$$Rs = \frac{tr_2 - tr_1}{w_2 + w_1} \qquad \alpha = \frac{tr_2 - t_0}{tr_1 - t_0} = \frac{k'2}{k'1}$$

La sélectivité α (HPLC) ou le ΔR_f (CCM) nous permettent d'évaluer la séparation.

PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE

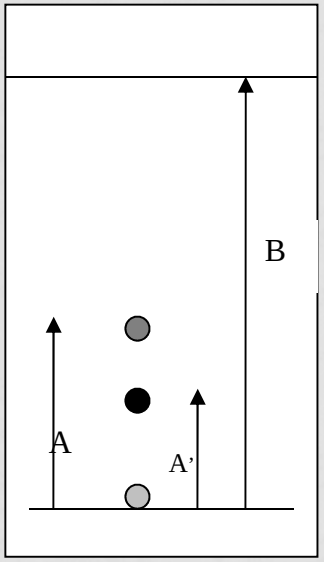
Sur Silice

CCM SUR SILICE

- Molécules faiblement à moyennement polaires
- **Hydrocarbure#halocarbure<Ether<Ester<Cetone<Amide<Alcool<Acide<Amine**
- Evaluation de la difficulté, mise au point pour la Flash Chromatographie
- Permet de prévoir une pré purification du produit avant purification(préparation d'échantillon).

CCM CONDITIONS DE MISE AU POINT

- Cuve CCM saturée (papier filtre dans la cuve fermée)
- Solution diluée
- Dépôt de petite taille
- $0,15 < R_f < 0,4$
- Mesure du ΔR_f



Front du solvant

A=1.8cm
A'=1.5cm
B=5cm

Rf 1= 0.36
Rf 2= 0.3

ΔRf= 0.06

TRANSPOSITION SUR SILICE

	CCM ΔR_f	HPLC α	Qtte de produit sur 20g de silice	Remarque silice 60Å surface spécifique 400m²/g
HPLC très difficile	0.01	1.07	0.006g	Mise au point HPLC silice 5 à 10µm colonne compression axiale (Silice 10µm sphérique) ou colonnes HPLC prep suivant la quantité à purifier
HPLC difficile	0.02	1.11	0.02g	
HPLC peu difficile	0.03	1.2	0.13g	Mise au point CCM Silice 15 à 50µm cartouche flash
Facile	0.08	1.8	1g	
Facile	0.1	2.12	1g	

La **quantité de produit** déposée est fonction de la **difficulté** évaluée et de la **surface spécifique** de la silice

CHOIX DE L'ELUANT SUR SILICE

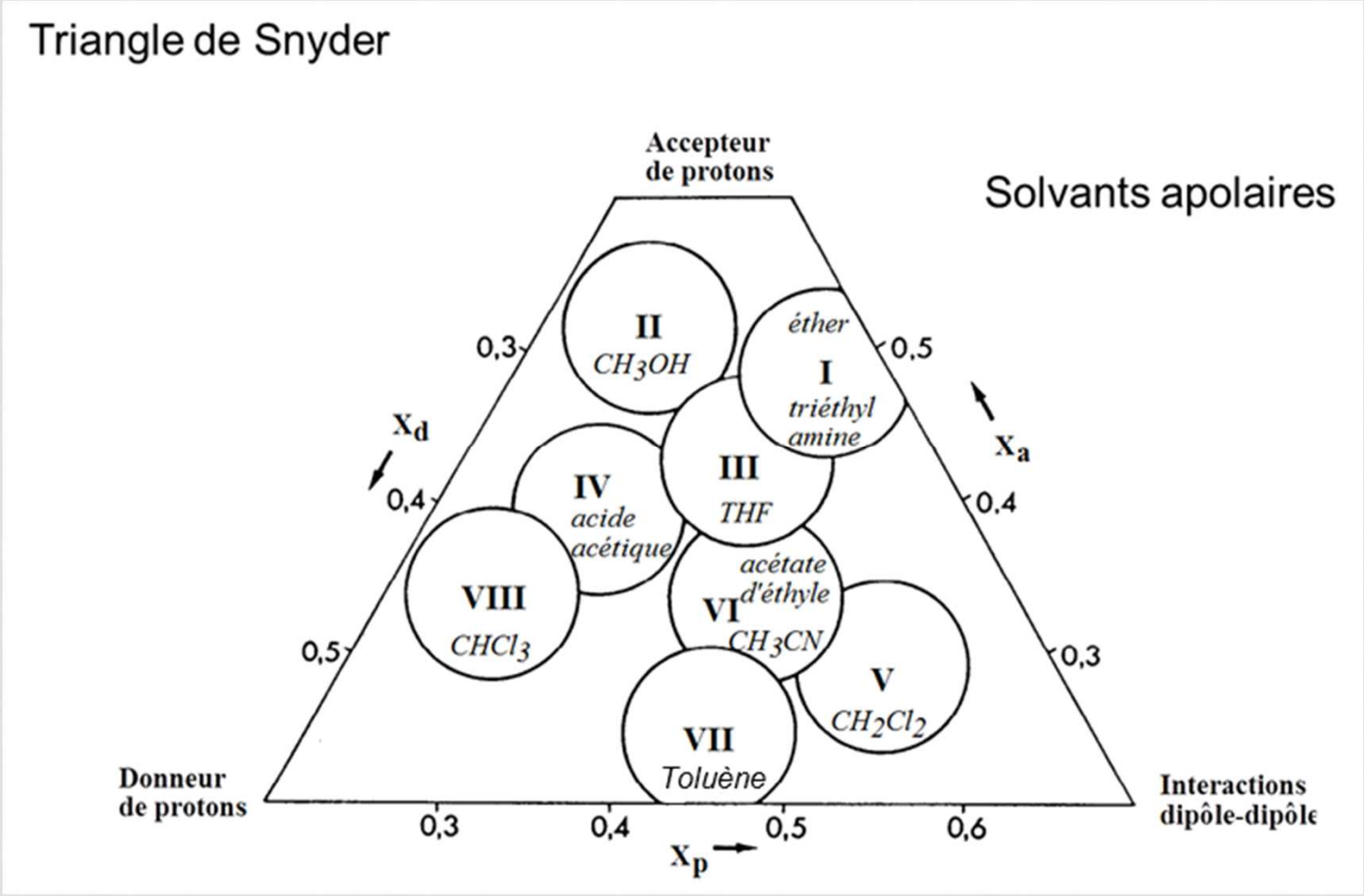
	Force éluante ε_0
solvant	Sur silice
alcanes	0
benzène	0,25
chloroforme	0,26
diéthyléther	0,30
dichlorométhane	0,32
triéthylamine	-
THF	0,35
acétone	0,43
acétate d'éthyle	0,48
acétonitrile	0,52
isopropanol	0,63
éthanol	0,68
méthanol	0,70
eau	>>0,70
acide acétique	>>0,70

La force éluante ε_0 d'un solvant ne reflète pas les propriétés de ce solvant à savoir les interactions dipôle-dipôle, le pouvoir accepteur ou donneur de proton.

Classement d'une série éluotropique, représentant le Rf d'un produit de référence élué avec les différents solvants de la liste

CHOIX DE L'ÉLUANT

TRIANGLE DE SNYDER



Ici les solvants sont classés suivant 3 paramètres disposés aux 3 coins du triangle

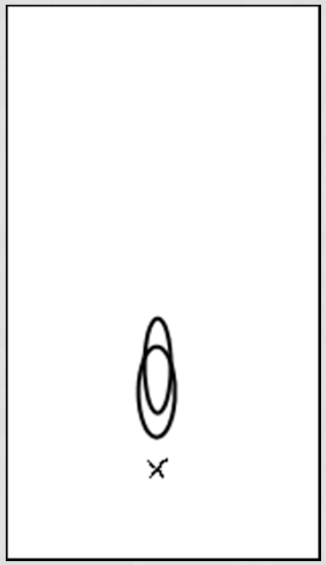
CHOIX DE L'ÉLUANT POLARITÉ P'

polarité P'	solvants apolaires	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
0-1,8	éther de pétrole hydrocarbure saturé								
1,9-3,6		éther Et_3N				CH_2Cl_2		toluène	
3,7-5,4		propyl amine	alcools CH_3OH	THF			acétate d'éthyle		$CHCl_3$
5,5-7,2					acide acétique		CH_3CN		
>7,3									eau

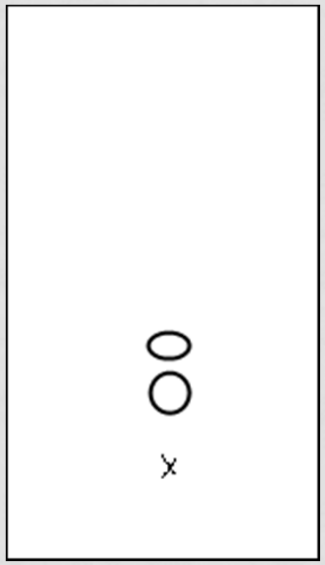
Cette représentation permet de tenir compte du triangle de Snyder et de la polarité des solvants

BIEN CHOISIR L'ÉLUANT

Choix des éluants ternaires



Eluant 40% CH2CL2
dans éther de pétrole



Eluant 80% EP/20%M
M=(20% AE/80%CH2CL2)

Ces 2 éluants ont la même force éluante $\varepsilon_{0,}$ mais une Polarité P' très différente

PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE

En phase inverse

CCM EN PHASE INVERSE

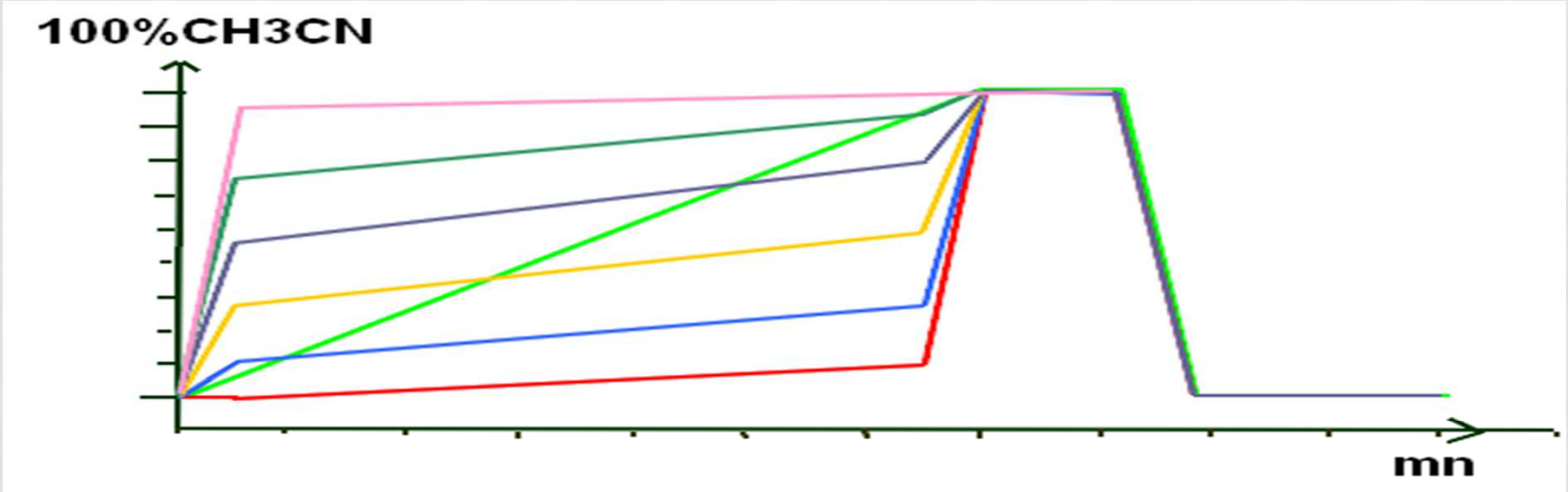
- Molécules polaires, qui nécessitent du méthanol pour être éluées en CCM sur silice, mais aussi les molécules moins polaires
- **Hydrocarbure#halocarbure<Ether<Ester<Cétone<Amide<Alcool<Acide<Amine**
- Permet d'évaluer la difficulté et les conditions d'élutions
- Pour une purification par HPLC en phase inverse passer par une mise au point par HPLC analytique (Même phase stationnaire en analytique et en « prep»)

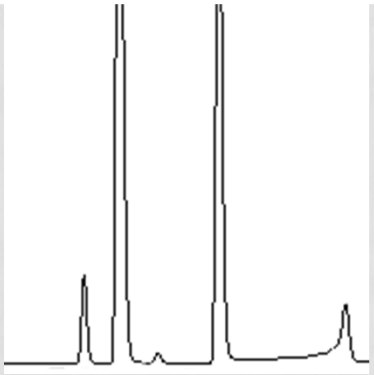
CHROMATOGRAPHIE EN PHASE INVERSE, MISE AU POINT HPLC

- La mise au point doit se faire sur une colonne de même phase stationnaire que la colonne « prep » (granulométrie, longueur).

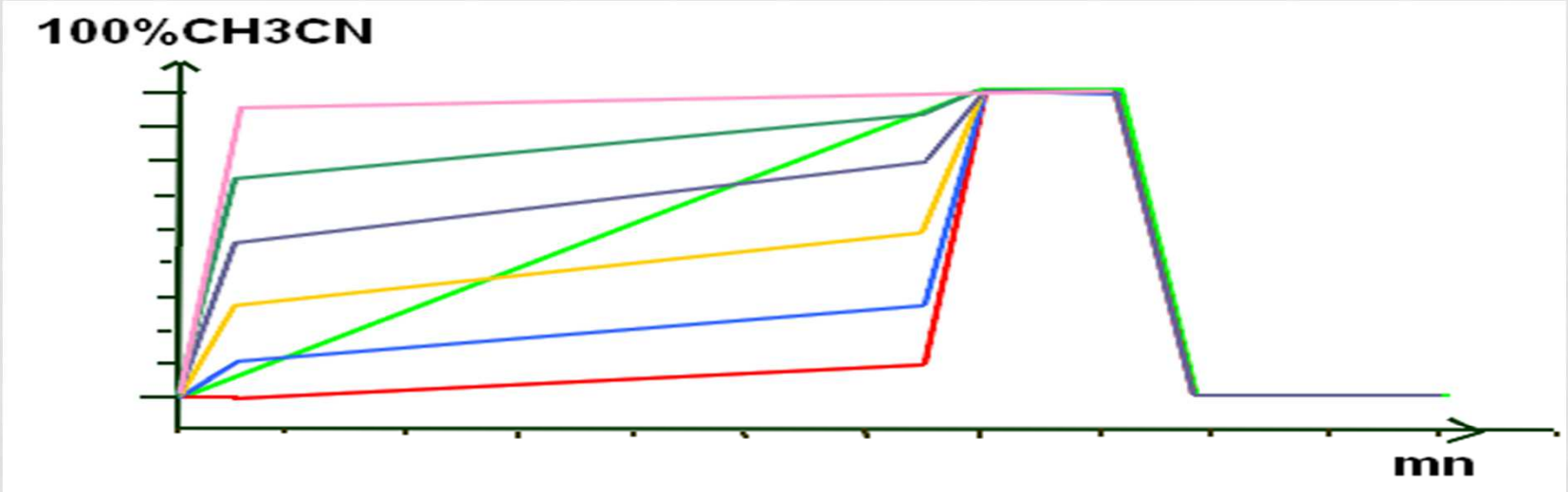
- Le mode d'exploration doit être le gradient d'élution:
  - 95/5 ⟹ 5/95 (Phase aqueuse/CH3CN ou MeOH)
  - Durée du gradient # longueur de la colonne
  - Repérer sur le chromatogramme la zone d'intérêt de la séparation
  - Adapter le gradient à cette zone d'intérêt

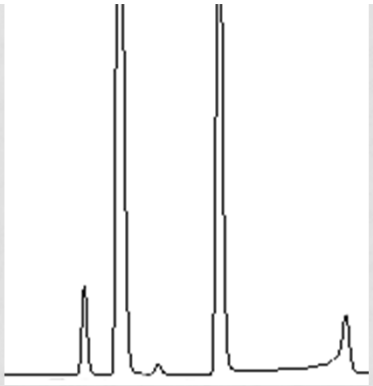
CHROMATOGRAPHIE EN PHASE INVERSE, MISE AU POINT



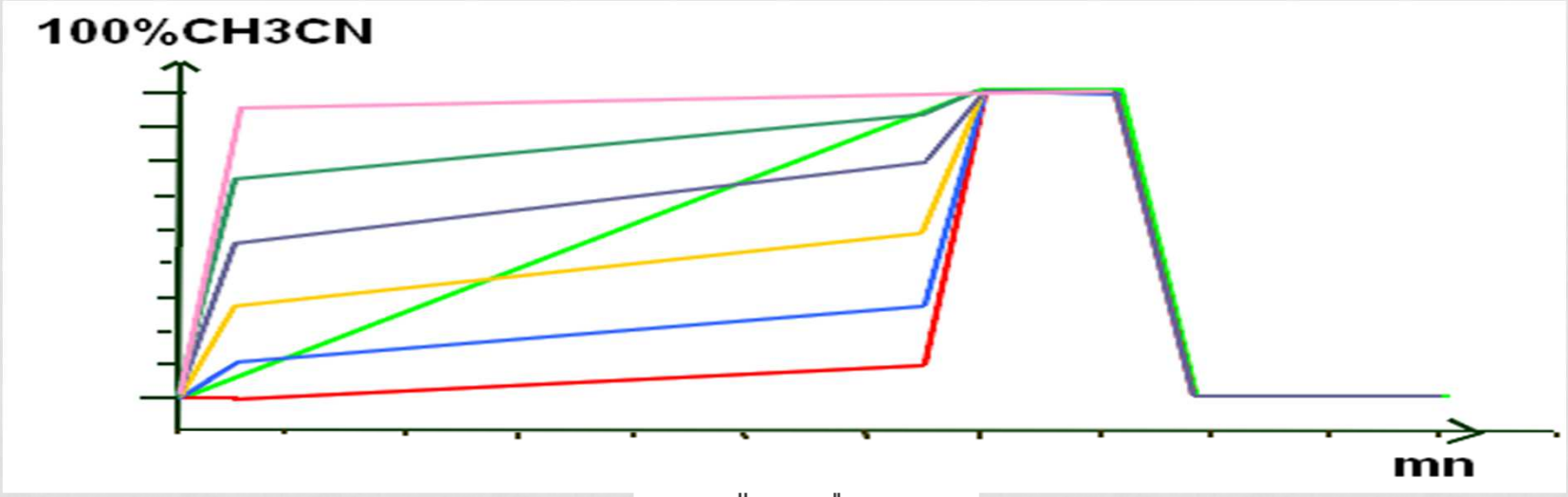


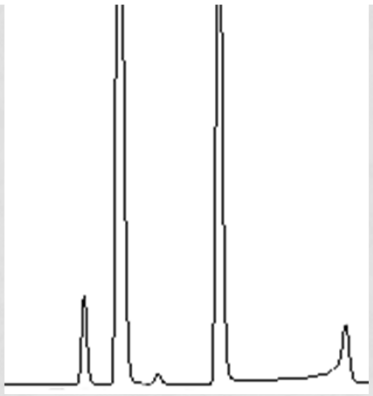
CHROMATOGRAPHIE EN PHASE INVERSE, MISE AU POINT



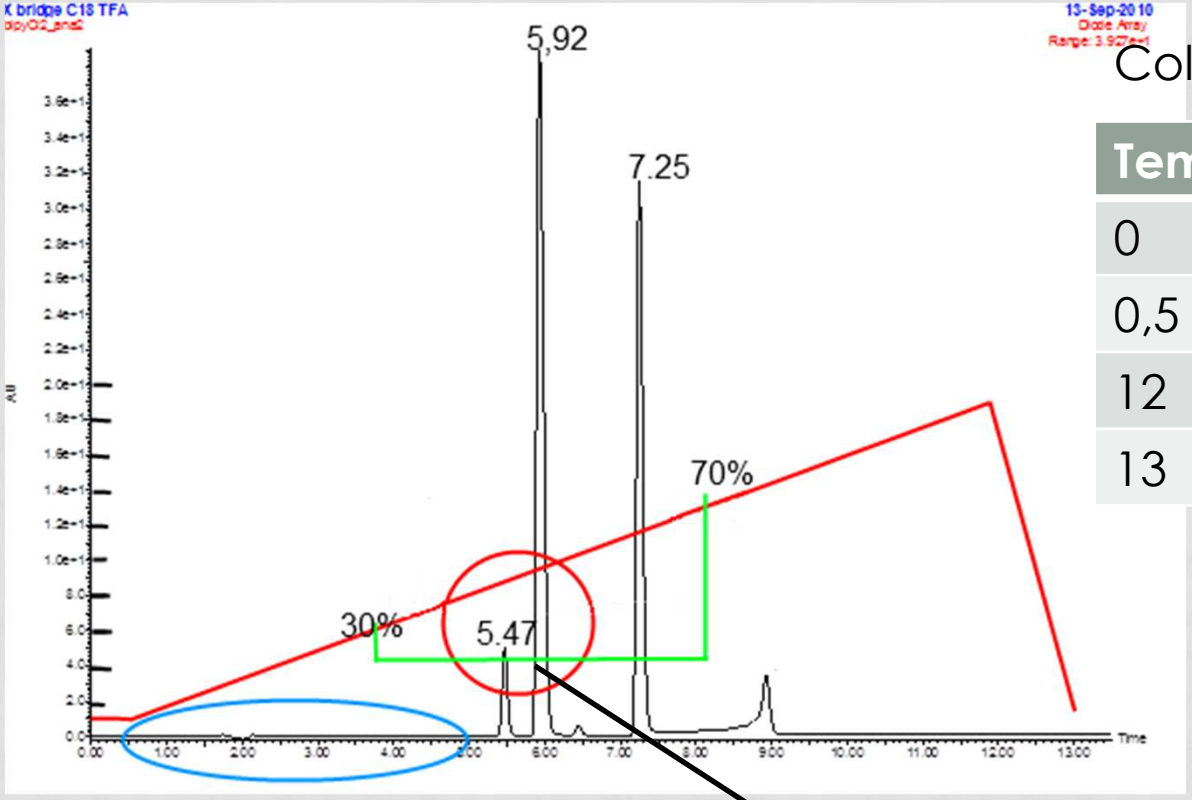


CHROMATOGRAPHIE EN PHASE INVERSE, MISE AU POINT





CHROMATOGRAPHIE EN PHASE INVERSE, MISE AU POINT



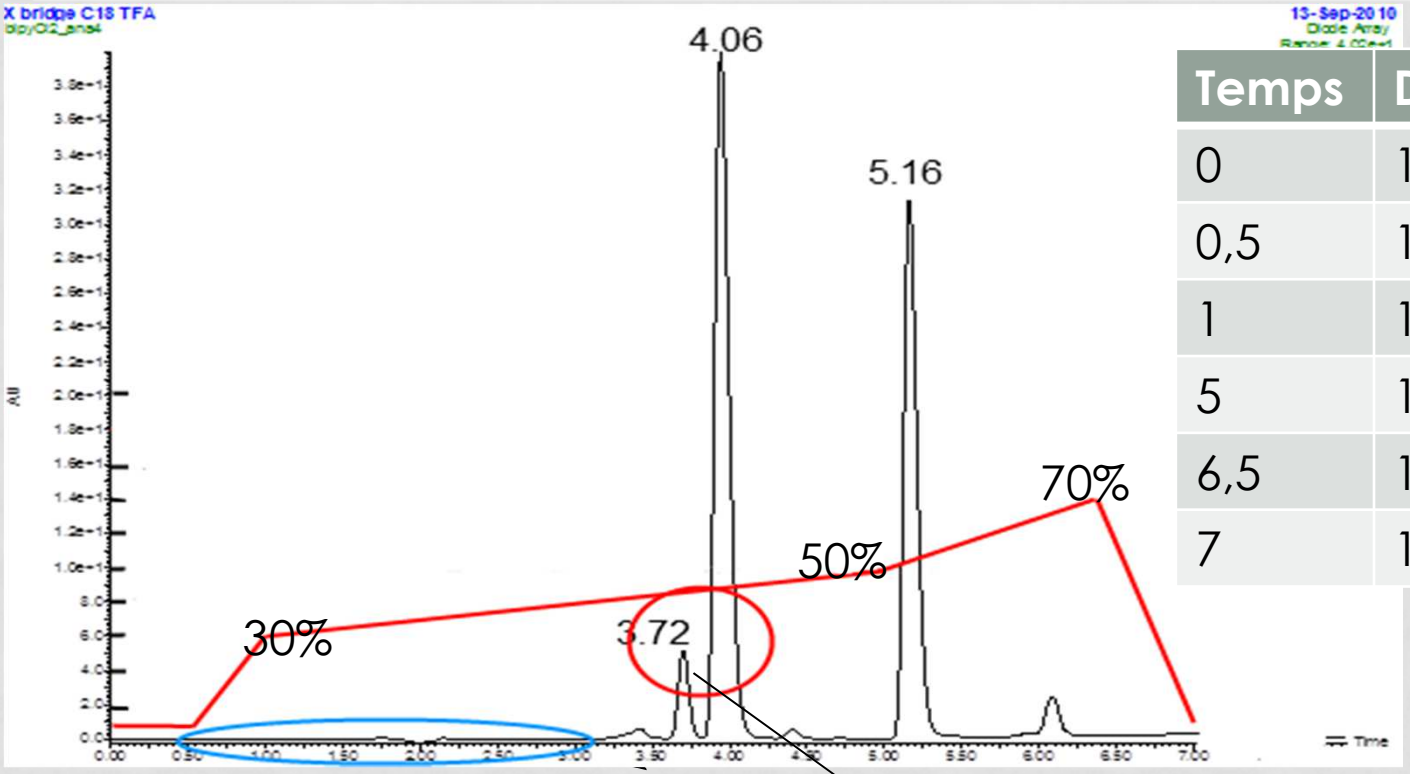
Colonne C18 150mmx4,6mm

Temps	Débit	A	B
0	1,2	95	5
0,5	1,2	95	5
12	1,2	5	95
13	1,2	95	5

Espace à réduire

$$\alpha = \frac{5,92-1,32}{5,47-1,32} = 1,11$$

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE INVERSE, MISE AU POINT



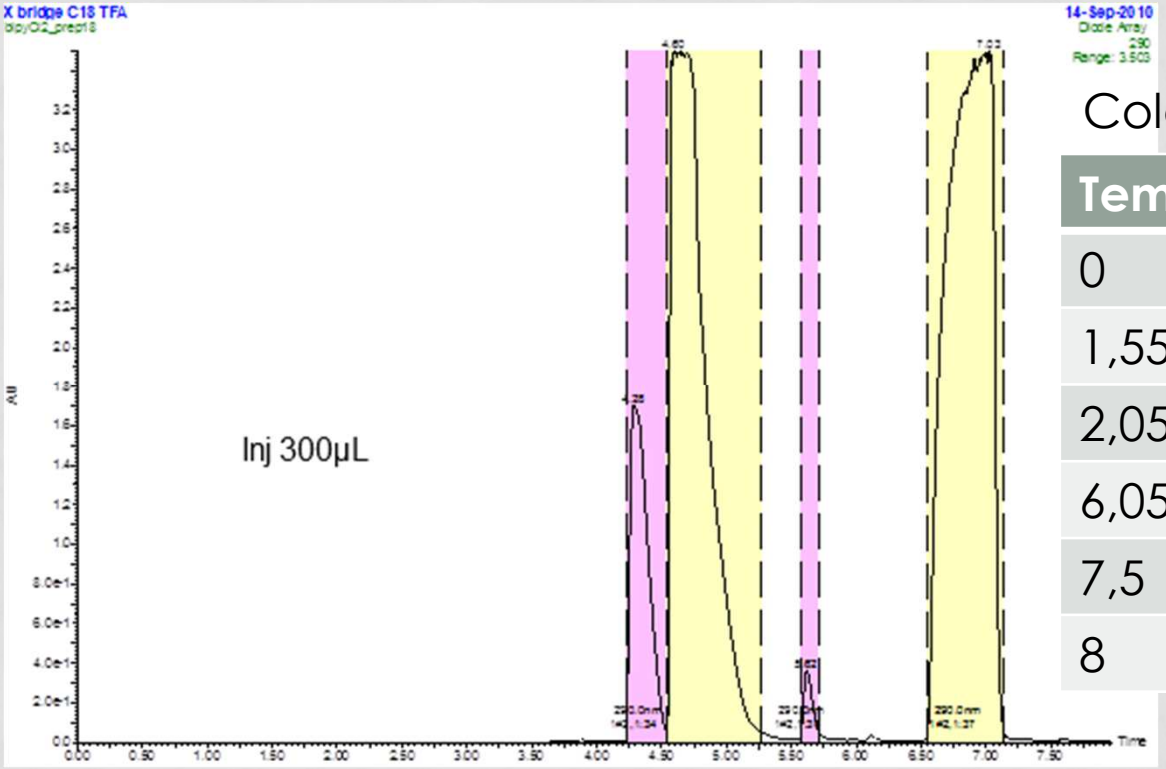
Temps	Débit	A	B
0	1,2	95	5
0,5	1,2	95	5
1	1,2	70	30
5	1,2	50	50
6,5	1,2	30	70
7	1,2	95	5

Gain de temps 2mn

$$\alpha = \frac{4,06-1,32}{3,73-1,32} = 1,14$$

Sélectivité augmentée

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE INVERSE, APPLICATION



Colonne C18 150mmx19mm

Temps	Débit	A	B
0	20	95	5
1,55	20	95	5
2,05	20	80	20
6,05	20	55	45
7,5	20	45	55
8	20	95	5

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE INVERSE, CHARGE

- C'est le point le plus délicat de la phase inverse
- Si on se réfère à la silice, il faut:
  1. connaître la surface spécifique de la phase
  2. le taux de greffage de la phase stationnaire
  3. Avoir évalué la difficulté de la séparation

- Grande quantité de produit, et critères de pureté élevés, il faut passer par une augmentation progressive de la charge, jusqu'à obtenir la quantité adaptée

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE INVERSE, CHARGE

- A l'échelle du laboratoire de synthèse il est rarement nécessaire de faire une étude de charge
- **Il faut évaluer la sélectivité**
- Les fabricants donnent des valeurs moyennes de charges pour leurs phases stationnaires

Charge moyenne = 4 à 6mg /g de phase stationnaire
pour α =1,2
La charge peut être 0,1 à 10 fois cette valeur suivant α

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE INVERSE, CHARGE

Charge moyenne en mg pour α=1,2

longueur/diamètre cm	1	1,9	2,1	3	5
5	15	45	50	110	310
10	25	90	100	225	260
15	40	135	150	335	930
25	60	225	250	560	1550

Poids de phase stationnaire en g = volume colonnex0,6

Longueur/diamètre en cm	1	1,9	2,1	3	5
5	2,4	8,5	9,4	21,2	58,9
10	4,7	17,0	18,8	42,4	117,8
15	7,1	25,5	28,3	63,6	176,6
25	65,3	42,5	47,1	106,0	294,4

FICHES PRATIQUES

PHASE INVERSE CHOIX DE L'ELUANT

- Espèces ionisées ou ionisables: contrôler l'état d'ionisation par un tampon volatil

	pH
0,1% TFA, 0,1% HCOOH	1,5 à 3
formiate d'ammonium	3,8 à 4,8
acétate d'ammonium	3,8 à 5,8
Triéthylamine/Acide acétique	7
Bicarbonate d'ammonium	6,8 à 8,8 8,2 à 10,2 9,3 à 11,3
Ammoniaque	8,2 à 10,2

- Le méthanol et l'acétonitrile apportent une sélectivité différente

PARAMÈTRES CHROMATOGRAPHIQUES

$V_0 = 0{,}5Ld^2$	**Volume mort de la colonne** **L longueur en cm, d diamètre en cm**
$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$	Facteur de rétention
$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_{r2} - t_0}{t_{r1} - t_0}$	sélectivité
$Rs = 2\frac{t_{r2} - t_{r1}}{w_1 + w_2}$	résolution
$R_f = \frac{1}{1+k'}$	correspondance entre CCM et HPLC
$k' = \frac{1 - R_f}{R_f}$	correspondance entre CCM et HPLC
$R_f = \frac{1}{V_0}$	correspondance entre CCM et HPLC

TRANSPOSITION DÉBIT

- Transposition du débit : $Débit2 = Débit1 * \frac{Ø_2^2}{Ø_1^2}$
- Durée du gradient : $t2 = t1 * \frac{L2}{L1} * \frac{Ø_2^2}{Ø_1^2} * \frac{Débit1}{Débit2}$
- Masse injectée $M2 = M1 * \frac{L2}{L1} * \frac{Ø_2^2}{Ø_1^2}$
- Ø1, Ø2 diamètre interne des colonnes
- L1, L2 longueur des colonnes
- *t1, t2* durée des gradients
- Pour une transposition correcte, il faut tenir compte des volumes des systèmes
- Logiciel de transposition

INJECTION EN PREP

- Le volume d'injection ne doit pas dépasser 10% du volume mort de la colonne
- Au-delà de 10% du volume mort on observe une perte de résolution par dispersion du produit

- Détermination du volume mort

  $V_0=0,5Ld^2$

  L longueur de la colonne en cm

  d diamètre de la colonne en cm

DÉPÔT SOLIDE EN FLASH CHROMATO

- Avantages:
  - Résoudre les problèmes de solubilité dans le solvant d'élution.
  - Réaliser une pré purification
- Mode d'emploi
  - Mettre le produit en solution dans le meilleur solvant (pas de DMSO, impossible à évaporer)
  - Rajouter la silice (jusqu'à 1g pour 4g de silice)
  - Evaporer doucement, il faut que la silice se décolle facilement de la paroi du ballon (poudre fine)
  - Placer dans une cartouche d'injection et tasser
  - Brancher sur la pompe et mouiller avec le solvant
  - Raccorder à la colonne dès que l'éluant sort de la cartouche

RÉCUPÉRATION DES PRODUITS PURIFIÉS

- Evaporation des solvants
  - Recyclage possible des solvants/ évaporateur rotatif avec cryostat: pour une autre utilisation contrôler le pouvoir éluant par CCM et adapter l'éluant à la séparation
- Concentration des fractions sur Sep Pack (phase inverse)
  1. Pour les fractions riches en acétonitrile
  2. La fraction est additionnée d'eau
  3. Elle est percolée sur un cartouche de C18 préparée en phase aqueuse.
  4. La cartouches est rincée à l'eau pour éliminer tampon et acide
  5. Le produit est élué avec l'acétonitrile ou le méthanol dans un volume faible.

LA SILICE: REPRODUCTIBILITÉ DES TEMPS DE RÉTENTION

- On observe lorsqu'on utilise des solvants naturellement secs (éther de pétrole, éther éthylique) une augmentation de la rétention au fur et à mesure des injections.
- Ce phénomène est lié à la désorption de l'eau naturellement présente sur la silice, qui entraine une augmentation de l'adsorption des produits.
- L'ajout dans l'éluant de quelques gouttes d'eau permet de mouiller le solvant et d'entretenir la présence d'eau sur la phase stationnaire

CONSERVATION DES CARTOUCHES FLASH

- Flash Silice: après nettoyage avec le solvant fort,(si possible éviter le méthanol qui s'adsorbe durablement sur la silice), rincer la cartouche avec de l'isopropanol. La cartouche peut être utilisée plusieurs fois après équilibration sur l'éluant.

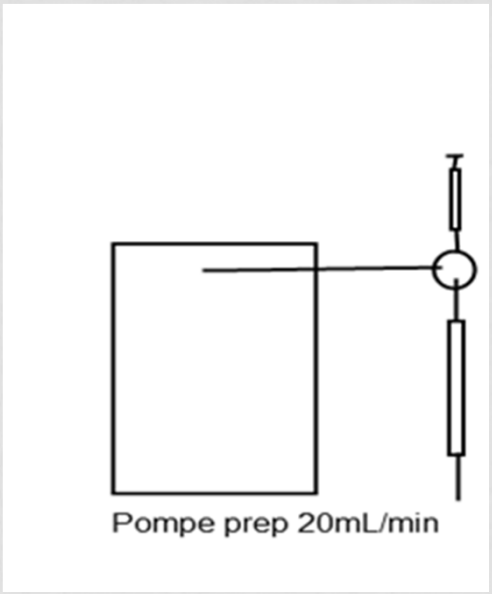
- La phase inverse adsorbe peu de produit, elle est rincée efficacement au méthanol, acétate d'éthyle ou dichlorométhane si nécessaire, puis mouiller avec l'isopropanol.

PROBLÈME D'INJECTION EN PHASE INVERSE

- Les composés à purifier en phase inverse ne sont pas suffisamment solubles dans l'éluant
- Si on choisit d'injecter dans un solvant plus fort que l'éluant, on peut observer une dégradation de la séparation, liée à la présence de ce solvant fort.

- **Solution possible:**
  - Le produit est solubilisé dans un solvant fort (DMSO, DMF, THF…)
  - L'injection se fait par l'intermédiaire d'une pompe additionnelle, délivrant de l'acétonitrile
  - Le mode d'élution est un gradient

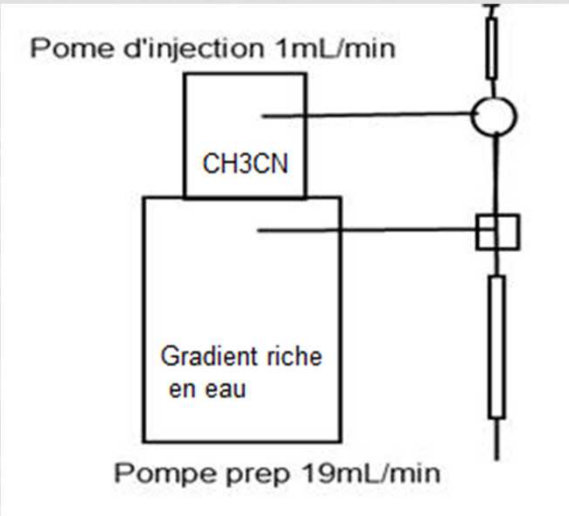
PROBLÈME D'INJECTION EN PHASE INVERSE: INJECTION CLASSIQUE



Injection du produit dans le DMSO
En cas d'utilisation d'un gradient d'élution: risque de précipitation dans l'injecteur

Déformation de la séparation par la présence du DMSO

PROBLÈME D'INJECTION EN PHASE INVERSE, POMPE ADDITIONNELLE

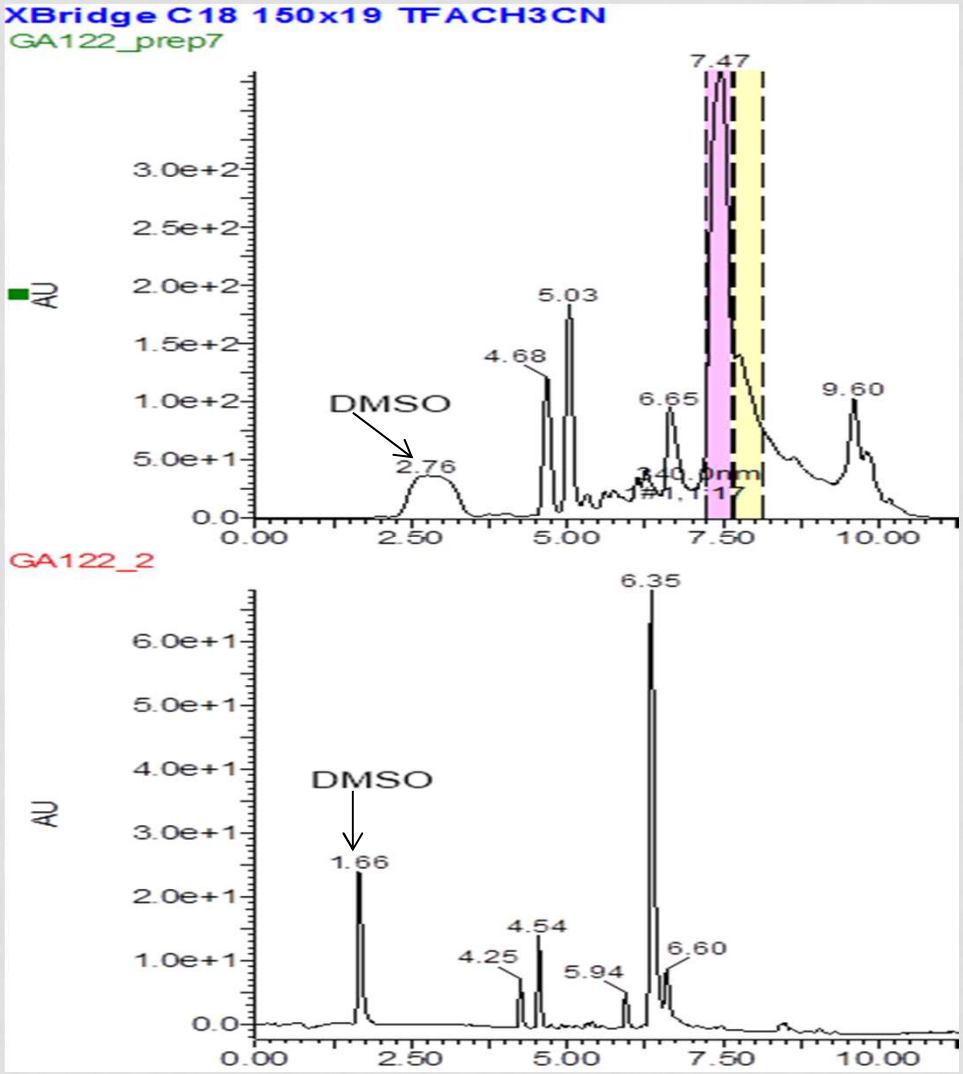


Le produit est mis en solution dans un solvant adapté. Il est entouré et poussé dans la colonne par un solvant fort.

L'utilisation d'un gradient riche en eau permet de fixer le produit en tête de colonne, et d'éluer Le DMSO ou le solvant fort

Le gradient optimisé permet d'obtenir la séparation

PHASE INVERSE INJECTION DANS LE DMSO



RINÇAGE ET RÉÉQUILIBRAGE DE LA COLONNE PHASE INVERSE

Rinçage et rééquilibrage d'une colonne 5V0+3V système (Système Autopurif Waters de l'ICT)

Volume système analytique 1,4mL		Volume système préparatif 2,4mL; Tr temps de rinçage			
Colonne	Volume mort	Colonne	Volume mort	Colonne	Volume mort
4.6x150mm	Vo=1.59mL	19x150mm	Vo=27mL	30x150mm	Vo=67.5mL
Tr=3Vs+5Vo					
Tr=3x1.4+5x1.59		Tr=3x2,40+5x27		Tr=3x2.4+5x67.5	
Tr=12,15mL		Tr=142,2mL		Tr=344.7 mL	
Débit 1,2mL/mn				Débit=50mL/mn	
Tr=10,12min		Tr=7.11min		Tr=6.9min	
4.6x50mm	Vo=0.53mL	19x50mm	Vo=9.03mL	30x50mm	Vo=22,5mL
Tr=3Vs+5Vo		Tr=3Vs+5Vo			
Tr=3x1.40+5x0.53		Tr=3x2.40+5x9.03		Tr= 3x2,4+5x22,5	
Tr=6,85mL		Tr=52,2mL		Tr=119,7 mL	
Débit 1.2mL/mn		Débit 20mL/mn		Débit 50mL/mn	
Tr=5,7min		Tr=2.6 min		Tr=2,40min	

SILICE/PHASE INVERSE

Molécule	Sur silice	Sur C18
	Phase stationnaire très polaire, interaction très forte: adsorption, éluant faible à moyennement fort	Phase stationnaire apolaire interaction faible: partage, éluant polaire et fort
apolaire	oui mais solvant parfois trop éluant	oui mais éluant type méthanol/ CH3CN/ DCM
Moyennement polaire	bon choix	bon choix si solubilité dans l'éluant
Diastéréoisomères	bon choix	possible
très polaires	impossible pour une vraie purification ou passer en HILIC	bon choix
Eluant	de l'Ether de pétrole à l'Acétate d'Ethyle l'emploi de Méthanol est possible	Eau méthanol, Acétonitrile, tampon volatil
Avantage	mise au point sur CCM, charge élevée, prix faible,très grand pouvoir séparatif sur les isomères	très reproductible, charge plus faible que la silice, prix élevé mais colonne recyclable, injection possible dans le DMSO si pompe supplémentaire
Inconvénient	silice difficile à nettoyer, en cas d'injections successives, il faut maîtrisser la quantité d'eau dans l'éluant pour avoir une bonne reproductibilité	charge plus faible que la silice, problème de solubilité dans l'éluant

SILICE/PHASE INVERSE

- Remarque :emploi du méthanol en phase directe: Le méthanol est un éluant très fort en phase directe, il interagit très fortement avec la silice
- CCM utilisant un faible % de méthanol (ex 3%/ CH3OH)

  Pour la transposition sur cartouche Flash,

  - préparer la cartouche sur CH2CL2 seul
  - Injecter le produit puis appliquer l'éluant qui a été optimisé en CCM (3% CH3OH)
- Si la cartouche est conditionnée sur l'éluant contenant le méthanol, celui-ci s'adsorbe sur la silice et le produit injecté est élué dans le volume mort

SILICE/PHASE INVERSE

- Pour utiliser un fort % de méthanol sur silice, il faut atteindre 20%de méthanol dans l'éluant. Dans ces conditions la silice est saturée de méthanol et il n'y a pas de modification de l'élution

- Ces conditions s'appliquent dans le cas de produits très polaires qui peuvent aussi être résolus en phase inverse.

CONTACT

- **http://spcmib.ups-tlse.fr**
- **http://ict.ups-tlse.fr**
- **http://cribligand.ipbs.fr/**

NOTES

NOTES